

本文引文格式:农进,梁琼,廖林,等. HMGB1对LPS诱导A549细胞自噬表达的调控作用[J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(3):302-305.

【论著与临床报道】

## HMGB1对LPS诱导A549细胞自噬表达的调控作用

农进<sup>1</sup>, 梁琼<sup>1</sup>, 廖林<sup>2</sup>, 李军<sup>1</sup>, 韦凌云<sup>1</sup>, 陆江玉<sup>1</sup>, 陈红<sup>1</sup>, 廖品琥<sup>3</sup>

(1. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;

2. 广西大学医学院, 广西 南宁 530004;

3. 右江民族医学院重症医学教研室, 广西 百色 533000)

**摘要:**目的 明确脂多糖(LPS)对A549细胞自噬的影响,初步探讨高迁移率族蛋白B1(HMGB1)对LPS诱导的A549细胞自噬表达的影响。**方法** CCK-8实验检测不同剂量的LPS对A549细胞存活率的影响,取最低毒性剂量的LPS诱导A549细胞构建急性呼吸窘迫综合征(ARDS)肺上皮细胞损伤模型;采用流式细胞术和透射电镜检测细胞死亡形式及细胞自噬情况;联合使用siRNA干扰技术干预、LPS处理A549细胞,随机分为空白组、LPS组、Si-HMGB1组、Si-HMGB1+LPS组。通过Western blot实验检测各组自噬表达水平。**结果** ①LPS处理A549细胞24h的最低毒性剂量为100 μg/ml,且细胞的死亡形式为自噬性细胞死亡;②siRNA干扰技术抑制HMGB1后,与LPS组相比,Si-HMGB1+LPS组的HMGB1和LC3B-II/LC3B-I的蛋白表达量明显下降,表达量介于空白组和LPS组之间,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** LPS可引起A549细胞自噬及自噬性细胞死亡,Si-HMGB1能抑制LPS诱导A549细胞自噬。

**关键词:**高迁移率族蛋白B1;自噬;A549细胞;呼吸窘迫综合征,成人

中图分类号:R563.8

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2021)03-0302-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.03.002

### Regulatory effect of HMGB1 on LPS-induced autophagy expression of A549 cells

Nong Jin<sup>1</sup>, Liang Qiong<sup>1</sup>, Liao Lin<sup>2</sup>, Li Jun<sup>1</sup>, Wei Lingyun<sup>1</sup>, Lu Jiangyu<sup>1</sup>, Chen Hong<sup>1</sup>, Liao Pinhu<sup>3</sup>

(1. *The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*; 2. *Medical College of Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China*;  
3. *Department of Critical Care Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of lipopolysaccharide (LPS) on the autophagy of A549 cells and the effect of high mobility group box-1 protein (HMGB1) on the autophagy expression induced by LPS.

**Methods** CCK-8 test was used to detect the effect of different doses of LPS on the survival rate of A549 cells. The lung epithelial cell injury model of acute respiratory distress syndrome (ARDS) was established by inducing A549 cells with the lowest toxic dose of LPS. Death and autophagy of cells were detected by flow cytometry and transmission electron microscopy. A549 cells were treated with siRNA interference technology as well as LPS. These cells were randomly divided into the blank group, the LPS group, the Si-HMGB1 group, and the Si-HMGB1+LPS group. The expression of autophagy in each group was detected by Western blot. **Results** ①The lowest toxic dose of LPS for treatment of A549 cells for 24 h was 100 μg/ml, and the cells died of autophagy. ②In comparison with the LPS group, the Si-HMGB1+LPS group had significantly decreased protein expressions of HMGB1 and LC3B-II/LC3B-I after HMGB1 was inhibited by siRNA interference technique. The above mentioned expressions in the Si-HMGB1+LPS group were between those of the blank group

**基金项目:**广西高校中青年教师科研基础能力提升资助项目(2020KY13024,2020KY13021);百色市科学研究与技术开发计划项目(百科 20193112)

**第一作者简介:**农进(1984-),男,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:ARDS发病机制,E-mail:yyfynongjin@126.com

**通讯作者简介:**廖品琥(1967-),男,博士,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:ARDS发病机制,E-mail:liaopinhu@163.com

and those of the LPS group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** LPS can induce autophagy and autophagic death of A549 cells, and Si-HMGB1 can inhibit autophagy induced by LPS in A549 cells.

**Key words:** high mobility group box-1 protein; autophagy; A549 cells; acute respiratory distress syndrome, adult

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是ICU病房中常见的一种严重综合征,随着俯卧位通气、体外膜肺氧合(ECMO)等高精技术的临床使用,其死亡率有所降低,但仍高达40%左右<sup>[1]</sup>。有研究显示过度的炎症反应失控是ARDS肺损伤的主要原因,然而使用炎症因子拮抗剂并不能有效降低病死率<sup>[2]</sup>。自噬性细胞死亡(auto-phagic cell death, ACD)是近年来新发现的细胞死亡形式,有望成为ARDS新的治疗靶点。

高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)是一种重要的细胞外晚期炎症介质,在细菌感染、败血症及其它刺激诱导的ARDS体内外模型中, HMGB1可在细胞内、核内或细胞外水平调节自噬。HMGB1与自噬相互作用在不同细胞类型中有着不一样的机制,且依赖触发损伤的性质<sup>[3]</sup>。内毒素是感染的重要原因之一,其主要成分为脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),本实验使用LPS刺激A549细胞,探讨HMGB1对肺泡上皮细胞的自噬是否具有调控作用,为制定新的治疗策略打下基础。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 A549细胞购于中国科学院干细胞库; LC3a/b、HMGB1、 $\beta$ -actin 购于 Affinity; CCK-8试剂购于 Fluorescence; 转染试剂 LP-2000 购于 invitrogen 公司; 凋亡检测试剂盒购于 Solarbio; 电镜固定液: 索莱宝; 无水乙醇、丙酮购于国药集团化学试剂有限公司; 812包埋剂购于 SPI; 凋亡检测试剂盒购于 Solarbio 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞的复苏、传代 从 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中快速取出细胞冻存管,立即放入 $37^{\circ}\text{C}$ 温水中融解; A549细胞复苏后常规培养、换液,当细胞生长至覆盖培养瓶约80%面积时,对细胞消化、传代后用于后续培养。

### 1.2.2 CCK-8检测LPS对A549细胞存活率的影响

取对数生长期的细胞接种于96孔板中。浓度为 $1 \times 10^4$ 个/毫升,加入不同浓度药物,同时设置空白组、正常对照组,每组设3个复孔, $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养24h;加入CCK-8溶液后, $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育2h;测450nm处的吸光度。

1.2.3 药物处理分组 (1)A549细胞融合度达80%时,分别用不同浓度的LPS作用于A549细胞24h, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理不同时间;(2)随机将细胞分为:①空白组;②LPS组;③Si-HMGB1组;④Si-HMGB1 +

LPS组。Si-HMGB1处理组中先siRNA转染A549细胞后,加入100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 24h。

1.2.4 细胞凋亡的检测 A549细胞培养、消化后,分为空白组和LPS组。严格按照流式细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。

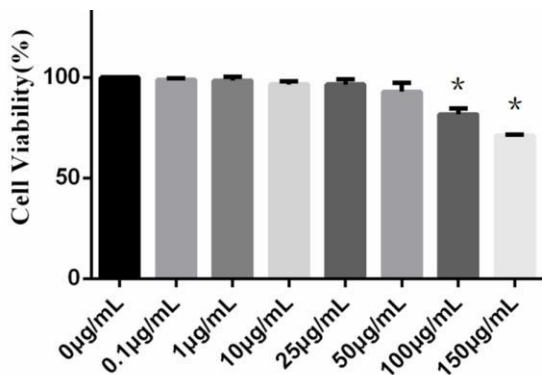
1.2.5 透射电镜法检测自噬超微结构 取对数生长期的A549细胞,加入100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的LPS,培养24h后,随后取材、固定、脱水、渗透、包埋、切片、染色等步骤处理后透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

1.2.6 Western blot检测相关蛋白表达 提取细胞的总蛋白,BCA试剂盒检测蛋白浓度。每组取等量蛋白行10% SDS-PAGE凝胶电泳,转移凝胶至PVDF膜,室温封闭2h,一抗 $4^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗膜,二抗 $37^{\circ}\text{C}$ 孵育90min,洗膜, ECL发光显影。通过Image J软件对蛋白印迹条带灰度值进行半定量分析,采用目标蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin条带灰度值来获得目标蛋白的相对表达水平。

1.3 统计学方法 所有实验均独立重复3次,统计学处理用SPSS 25.0统计软件,计量资料数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示,行正态性分析及方差齐性检验,方差齐则行单因素方差分析,  $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

## 2 结果

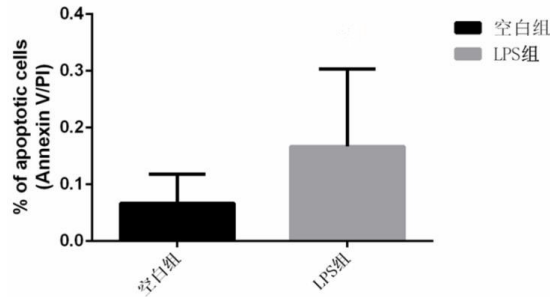
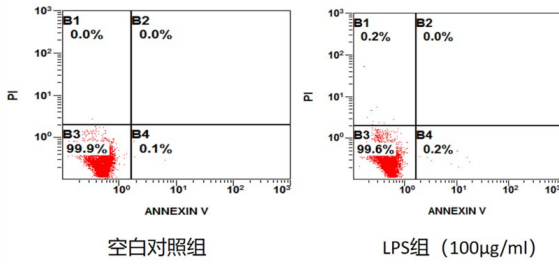
2.1 LPS对A549细胞存活率的影响 使用不同浓度的LPS作用于A549细胞24h后, CCK-8法检测结果见图1显示,剂量 $< 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的LPS处理后,细胞活性无明显改变,与正常对照组(0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),剂量达到100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之后细胞存活率明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),取此剂量用于后续ARDS肺泡上皮细胞损伤的细胞造模剂量。



注:与空白对照组(0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )相比, \*  $P < 0.01$ 。

图1 CCK8检测不同剂量的LPS对A549细胞活力的影响

2.2 最低细胞毒剂量的 LPS 对 A549 细胞损伤不依赖凋亡和坏死 为了进一步验证细胞存活率的下降是否依赖于凋亡和坏死,采用 Annexin V-FITC 和 PI 双染法,检测 100  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 作用于 A549 细胞 24 h 的细胞凋亡和坏死情况。由图 2 散点图可见,LPS 处理组的 B1、B2、B4 与对照组比较,细胞数无明显增加,细胞凋亡率、坏死与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。可见,浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 作用 A549 细胞之后,细胞存活率下降不依赖于凋亡和坏死。



注:上图为空白组和 LPS 组的散点图, 下图为两组细胞凋亡率统计分析结果。

图 2 流式细胞技术检测 LPS 对 A549 细胞凋亡影响

2.3 LPS 诱导后 A549 细胞透射电镜观察细胞超微结构 透射电镜观察如图 3 所见:正常对照组中:未见典型结构自噬小体,自噬溶酶体 (ASS) 少量存在。LPS 组中:线粒体数量较少,胞质中大量的自噬小体 (AP) 和自噬溶酶体,未见凋亡小体形成,核膜完整。结果提示 LPS 能引起 A549 细胞自噬,结合上述流式细胞检测结果及自噬性细胞死亡的特征,LPS 引起的细胞存活率下降为自噬性细胞死亡。

2.4 RNA 干扰 A549 细胞 HMGB1 后各组蛋白表达比较 为了验证 HMGB1 是否可以介导 LPS 诱导的 A549 细胞自噬及自噬性细胞死亡,我们使用最低毒性剂量的 LPS (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 刺激 A549 细胞 24 h,联合使用 siRNA 干扰 HMGB1 的表达干预 A549 细胞,Western blot 实验检测自噬相关蛋白。结果如图 4 所见:正常组的 A549 细胞仅有微量的 HMGB1 和自噬相关蛋白 LC3B-II 表达,LPS 诱导后明显增加 A549 细胞 HMGB1 和 LC3B-II 的蛋白表达量。Si-HMGB1

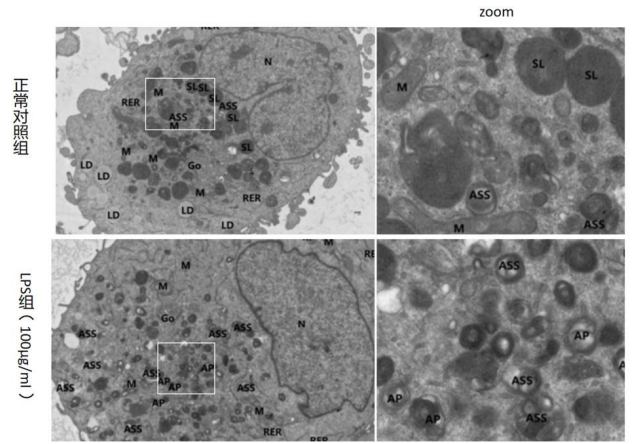
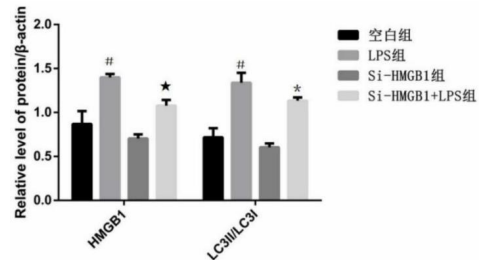
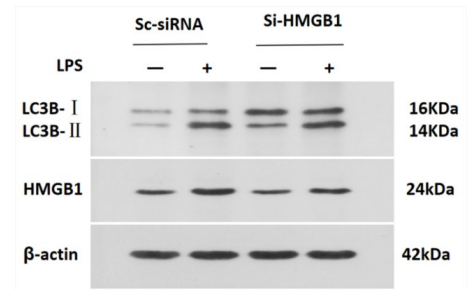


图 3 LPS 诱导后 A549 细胞的透射电镜细胞超微结构

干预后,LC3B-II/LC3B-I 和 HMGB1 的蛋白表达量介于 LPS 组和空白组,与 LPS 组相比,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Si-HMGB1 能抑制 LPS 诱导 A549 细胞 LC3B-II/LC3B-I 的表达。



注:与空白组比, #  $P < 0.01$ ;与 LPS 组相比, ★  $P < 0.01$ ; 与 LPS 组相比, \*  $P < 0.05$ 。

图 4 Si-HMGB1 对 A549 细胞 HMGB1 和自噬蛋白表达的影响

### 3 讨论

ARDS 的病因复杂,有肺内因素的直接作用和肺外因素间接作用,其中脓毒症或脓毒性休克是 ARDS 发病的主要原因,也是急危重症病房死亡率很高的综合征。正常情况下,自噬能维护细胞稳态,有利于细胞的存活,起到清除细胞内垃圾的作用<sup>[4]</sup>。然而当刺激因素到达一定时间,刺激强度超过一定范围时,会出现不利于细胞存活的作用,正确认识细胞自噬的双重作用及其具体的分子机制有利于 ARDS 的防治<sup>[5-6]</sup>。

HMGB1 广泛分布于肺、脑、肝、心、肾等各器官。在细胞核内,HMGB1 可与 DNA 非特异性结合,参与

复制、重组、转录和 DNA 修复等过程,参与多种生命活动,病理情况下,胞内 HMGB1 可通过主动分泌与被动释放进入胞外,进而参与炎症反应, HMGB1 在炎症过程中起重要作用<sup>[7]</sup>。细胞外的 HMGB1 通过促进核因子(NF)- $\kappa$ B 的核易位而导致炎症细胞因子的释放,从而诱导 ARDS,参与细胞凋亡和自噬<sup>[8-9]</sup>。HMGB1 作为脓毒症的晚期炎症因子,据报道,内毒素诱导动物模型中, HMGB1 在诱导后 8 h 时表达明显增高,至 32 h 仍然维持较高水平<sup>[10]</sup>。有关 HMGB1 和自噬在 ARDS 肺上皮细胞损伤的研究表明,自噬激活剂可抑制 LPS 诱导的 A549 细胞的凋亡,并改善小鼠 ARDS 的肺损伤<sup>[11]</sup>。研究还发现 LPS 刺激 A549 细胞产生自噬和 ACD,自噬表达量依赖于 LPS 的作用的时间和浓度,自噬激活剂可加重细胞损伤<sup>[12]</sup>。可见,自噬对细胞具有双重作用。研究也发现,在氧化应激过程中, HMGB1 能促进自噬,抑制 HMGB1 出核可以降低 ARDS 的自噬和减少细胞死亡<sup>[13]</sup>。HMGB1 和自噬与 ARDS 的肺损伤发病机制关系密切。

本研究结果显示,正常组 A549 细胞自噬水平表达很低,使用最低剂量的细胞毒性的 LPS 作用于 A549 细胞 24 h 后 HMGB1 和自噬相关蛋白 LC3B-II/LC3B-I 的表达量增加,并出现不依赖于凋亡、坏死的细胞存活率下降。研究认为 ACD 的特征为:胞质中大量的自噬小体,无凋亡小体形成和细胞核无变化,不依赖于 caspase<sup>[14-15]</sup>。我们采用透射电镜观察到 LPS 可引起 A549 细胞自噬,且胞质中出现了大量的自噬小体和自噬溶酶体,未见凋亡小体形成,核膜完整等 ACD 的特征。可见,100  $\mu$ g/ml 的 LPS 作用于 A549 细胞 24 h 后可出现 ACD。为了进一步验证 HMGB1 与 A549 细胞自噬和自噬性细胞死亡关系,实验采用 RNA 干扰技术沉默 HMGB1,结果通过干预后 LPS 诱导的 A549 细胞自噬相关蛋白 LC3B-II/LC3B-I 表达明显下降,提示 HMGB1 可介导 LPS 诱导 A549 细胞自噬与 ACD。既往研究发现,当高水平的自噬持续刺激,超出阈值时,对细胞是不利的,参与疾病的发生发展<sup>[16]</sup>,我们的研究与该研究相符。

综上所述,本研究发现 LPS 诱导 A549 细胞产生自噬及自噬相关的细胞死亡,可能参与肺泡上皮细胞损伤过程,抑制 HMGB1 可降低 LPS 诱导的 A549 细胞的自噬。由此推测,当脓毒症的病情发生发展到一定阶段,可引起肺泡上皮细胞 ACD 从而导致了 ARDS 的发生,由此可对 ARDS 患者进行自噬表达的检测,根据自噬表达量,通过干预 HMGB1 来调节自噬有望成为 ARDS 治疗的靶点。

#### 参考文献:

[1] Wang D, Gu CP, Liu MJ, et al. Analysis of Long Noncoding RNA Expression Profile in Human Pulmonary Micro-

vascular Endothelial Cells Exposed to Lipopolysaccharide [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(4): 653-667.

- [2] Calfee CS, Matthay MA. Nonventilatory treatments for acute lung injury and ARDS [J]. *Chest*, 2007, 131(3): 913-920.
- [3] Qu LH, Chen CY, Chen YY, et al. High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) and Autophagy in Acute Lung Injury (ALI): A Review [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1828-1837.
- [4] 张露, 蒋梦彤, 陈昱, 等. 自噬在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2016, 32(7): 1018-1021.
- [5] 张红, 赵自刚, 牛春雨. 细胞自噬在急性肺损伤发展进程中的双刃剑作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(4): 725-734.
- [6] Zhang D, Li CC, Zhou J, et al. Autophagy protects against ischemia/reperfusion-induced lung injury through alleviating blood-air barrier damage [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2015, 34(5): 746-755.
- [7] Luan ZG, Hu B, Wu L, et al. Unfractionated Heparin Alleviates Human Lung Endothelial Barrier Dysfunction Induced by High Mobility Group Box 1 Through Regulation of P38-GSK3 $\beta$ -Snail Signaling Pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 1907-1918.
- [8] Lee S, Piao C, Kim G, et al. Production and application of HMGB1 derived recombinant RAGE-antagonist peptide for anti-inflammatory therapy in acute lung injury [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 114: 275-284.
- [9] 杨复铨, 刘东菊, 潘路娟, 等. HMGB1 调控重症急性胰腺炎脾淋巴细胞凋亡的实验研究 [J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(1): 22-27.
- [10] 姚咏明. 急危重症病理生理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2019: 261-263.
- [11] Yen YT, Yang HR, Lo HC, et al. Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis-induced acute lung injury [J]. *Surgery*, 2013, 153(5): 689-698.
- [12] Li SY, Guo L, Qian P, et al. Lipopolysaccharide Induces Autophagic Cell Death through the PERK-Dependent Branch of the Unfolded Protein Response in Human Alveolar Epithelial A549 Cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(6): 2403-2417.
- [13] Tang D, Kang R, Livesey KM, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2010, 190(5): 881-892.
- [14] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2891-2906.
- [15] Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2009, 373(9680): 2055-2066.
- [16] Shimizu S, Yoshida T, Tsujioka M, et al. Autophagic cell death and cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 3145-3153.

收稿日期: 2021-05-08; 修回日期: 2021-05-26